

Bacillus stearothermophilus Acetyl Xylan Esterase 유전자(*estII*)의 클로닝과 *Escherichia coli*에서의 발현

김희선 · 엄수정 · 조쌍구 · 최용진*
고려대학교 유전공학과

Molecular Cloning and Expression of the Acetyl Xylan Esterase Gene(*estII*) of *Bacillus stearothermophilus* in *Escherichia coli*

Kim, Hee-Sun, Soo-Jung Eom, Ssang-Goo Cho and Yong-Jin Choi*
Department of Genetic Engineering, Korea University, Seoul 136-701, Korea

Abstract — *Bacillus stearothermophilus*, a strong xylan degrader, was confirmed to express multiple esterase activities in addition to the major xylanolytic enzymes. One of the genes encoding the esterases was isolated from the genomic library of *B. stearothermophilus* constructed with *EcoRI* restriction endonuclease and pBR322 plasmid. Three recombinant plasmids showing the tributyrin degrading activity were selected from approximately 7,000 *E. coli* HB101 transformants, and were found to have the same insert of a 3.2 kb DNA fragment. Restriction mapping and hybridization studies revealed that the gene(*estII*) on the hybrid plasmid (pKMG7) had originated from the *B. stearothermophilus* chromosome, and was distinct from the *estI*, another esterase gene of *B. stearothermophilus* isolated in the previous work. The *E. coli* cells harboring pKMG7 produced an acetylxylan esterase that exhibited similar substrate specificity to the esterase encoded by the *estI* gene.

Hemicellulose의 주성분인 xylan은 β -1,4-xylopyranoside 주 탄소 골격에 acetyl, arabinosyl 및 glucuronosyl 등의 잔기로 구성된 각종 측쇄결합을 가지고 있는 매우 복잡한 구조의 복합 다당류이다(1-3). 실제로 hardwood xylan은 구성 xylose 잔기의 약 70%가 아세틸화 되어 있으며(4), 이와 같은 xylan의 아세틸화는 xylan 분해계 주효소 작용에 대한 xylan 분자의 저항성과 직접적인 관계를 가지고 있다는 것이 생체 내외 실험에 의해 확인 보고되고 있다(5-7). 더우기 생체내에서의 xylan 분자는 phenol substituent에 의해 xylan 분자 상호간 혹은 lignin과 같은 다른 다당류 성분과 cross-link 되어 있기 때문에 일반적으로 미생물에 의한 분해에 대해 더욱 큰 저항성을 가지고 있는 것으로 분석되고 있다(8, 9). 따라서 native xylan을 완전 가수분해하기 위해서는 internal xylosidic linkage 절단에 필요한 xylanase와 β -xylosidase와 같은 xylan 분해계 주효소 외에도 각종 탈

측쇄효소(debranching enzyme)의 협동적 작용이 필수적인 것으로 분석되고 있다(10-14). 그러나 지금까지 보고되고 있는 다수의 xylan 분해 미생물은 한가지 종류의 xylan 분해계 효소를 생산하는 것이 아니고 각종 xylan 분해효소를 다양하게 생산할 뿐만 아니라 약간의 특성 차이를 가지고 있는 서로 다른 여러 개의 같은 종류의 분해효소를 생산(enzyme multiplicity)하여, native xylan 기질을 효율적으로 분해 이용하고 있는 것으로 알려지고 있다(15).

본 연구실에서 분리한 강력한 xylan 분해 균주인 *Bacillus stearothermophilus* 역시 xylanase(17)와 β -xylosidase(18)는 물론이고 지금까지 보고 예는 극히 드물지만 acetyl esterase와 β -arabinofuranosidase의 multiplicity 현상도 나타내고 있는 것으로 확인되었다. 그러므로 본 연구에서는 *B. stearothermophilus*로부터 전보(19)에 보고한 바 있는 acetyl xylan esterase로 분류할 수 있는 acetyl esterase 생산 유전자(*estI*)에 추가하여 또 다른 acetyl esterase 생산 유전자(*estII*)를 분리, *E. coli*에 클로닝하여 그 결과를 보고하고자 한다.

Key words: Acetyl xylan esterase, *Bacillus stearothermophilus*, molecular cloning
*Corresponding author

재료 및 방법

사용 균주와 plasmid

Acetylcysteine 생산 유전자 공여 균주는 토양 분리 균인 *Bacillus stearothermophilus*(16)이었고 유전자 클로닝에 이용한 숙주세포는 *E. coli* HB101(F⁻, *hsdS* 20, *recA13*, *ara14*, *proA2*, *lacY1*, *galK2*, *rpsL20*, *xy15*, *mt11*, *supE44*)(20)이었으며, 클로닝 vector로는 pBR 322(21)를 사용하였다. 또한 대조 효소로는, 본 연구실에서 분리 클로닝하여 얻은 *B. stearothermophilus estI* 유전자를 포함하고 있는 pKMG6 재조합 플라스미드가 생산하는 acetyl xylan esterase(19)를 이용하였다.

사용시약 및 효소

Lysozyme, ribonuclease A, oat spelt xylan 및 birchwood xylan 등은 Sigma Co.(St. Louis, MO.), calf intestinal alkaline phosphatase(CIP)와 DNA labeling and Detection Kit는 Boehringer Mannheim(Mannheim, Germany), Gene Clean II kit는 Bio 101 Inc. (La Jolla, CA, USA)에서 구입하였다. 또한 Nylon membrane은 Amersham 제품인 Hybond-N⁺를 사용하였으며 기타 일반 시약류는 시판되는 일급이상의 분석용을 사용하였다. 그리고 각종 제한효소와 T4 DNA ligase는 New England Biolab(Beverly, MA, USA) 또는 Toyobo사로부터 구입 사용하였다.

효소액 조제

*B. stearothermophilus*는 본 실험실에서 확립 보고한 바 있는 효소 생산 최적 배지(16)에서 45°C, 22시간 그리고 *E. coli* 형질전환체는 ampicillin이 첨가된 LB 배지에서 37°C, 18시간 진탕 배양하였다. 세포의 효소의 경우는 균체를 완전히 제거한 상기 균주 배양액을 그대로 효소액으로 사용하였다. 세포내 효소는 균체를 모아 적당량의 인산 완충용액(50 mM, pH 6.5)으로 현탁시켜 28 KHz에서 3분간 초음파 처리(SUH ILL ultrasonic Co. type KSK150)후 5000 rpm에서 10분간 원심분리(Sorvall centrifuge, A50 Rotor)하여 얻은 상등액을 효소액으로 사용하였다.

Zymogram

효소 시료액을 두개의 동일 8% nondenaturing polyacrylamide gel을 사용하여 100 V에서 90분간 전기영동하여 단백질을 분리하였다. 단백질 분리가 끝난 gel은 coomassie blue로 염색하여 단백질 분리대를 관찰하였고 다른 한 gel은 인산 완충 용액(pH 6.5)

으로 세척한 다음 5 mM 4-methylumbelliferyl acetate agar gel과 접촉시켜 45°C에서 적절한 시간 동안 반응시켜 효소 반응에 의해 생성되는 효소활성대(activity bands)를 UV light 조사(22)로 확인하였다.

DNA분리 및 형질전환

Chromosomal DNA는 전보(18)에 상술한 Doi(23)의 방법에 따라 분리하였고, plasmid DNA는 rapid alkaline lysis 법(24)을 이용하여 분리하였다. 그리고 형질전환은 Simanis 방법(25)에 따라 실시하였다. Gel electrophoresis는 Maniatis 방법(24)에 준해 TAE buffer를 이용하여 실시하였으며, agarose gel 상에 분리된 DNA 단편은 Gene Clean kit를 이용하여 회수하였다.

Acetyl esterase 유전자 clone의 선별

약 7,000개의 형질전환체를 1% tributyrin과 50 µg/ml ampicillin이 첨가된 LB 한천배지에 접종하고 37°C에서 18시간 배양하였다. 형질전환체 중에서 배양 중 생산하는 효소에 의해 tributyrin을 분해함으로써 colony 주위에 투명환을 형성하는 형질전환체를 선별하였다(26).

Southern blotting

Agarose gel 상의 DNA 단편은 Capillary blot transfer법에 따라 Hybond-N⁺ membrane으로 옮기고, 전보(18)에 상술한 과정에 준해 DNA hybridization을 실시하였다. 그리고 DNA labeling과 detection은 digoxigenin-anti-digoxigenin ELISA 방법(27)에 따랐으며, probe DNA는 acetyl esterase 활성과 관계된 pKMG7에 삽입된 3.2 kb DNA 단편과 HindIII 절단 λDNA 단편을 dig labeling 한 것을 사용하였다.

Acetyl xylan 조제

Oat spelt xylan은 전보(19)에서 설명한 Johnson 등의 화학적 방법(28)에 따라 아세틸화시켰다. Birchwood xylan 10 g을 250 ml dimethyl sulfoxide에 첨가하여 60°C에서 완전용해시키고, dimethylaminopyridine 2.5 g 첨가한 후 acetic anhydride 200 ml을 천천히 첨가하여 완전 혼화시키면서 아세틸화시켰다. 생성된 birchwood acetyl xylan은 4°C, 증류수 중에서 충분히 투석시킨 후 여과 분리하였다. 분리 acetyl xylan은 재차 acetone에 녹여 불용성 xylan을 제거한 다음 동결건조시켰다. ¹³C NMR 분석으로 xylan의 아세틸화를 확인(28)하였다.

효소 활성 측정

Esterase 효소 활성 : Methylacetylsalicylate(MAS)를 기질로 사용하여 Iwai 등(29)의 방법에 따라 측정하였다. 1분 동안에 1 μ mole의 methylsalicylate를 생성할 수 있는 효소량을 1 unit로 표시하였다.

p-Nitrophenylester에 대한 효소 활성 : 50 mM p-nitrophenylester 인산 완충용액(50 mM, pH 6.5) 100 μ l에 동량의 효소액을 가하여 45°C에서 20분간 반응시킨 후, 2 ml의 증류수를 첨가하여 반응을 정지시키고 405 nm에서 흡광도를 측정 분석하였다. 효소 활성은 1분에 1 μ mole의 nitrophenol을 생성할 수 있는 효소량을 1 unit로 정하였다.

각종 아세틸화 기질에 대한 효소 활성 : β -D-Xylose tetraacetate, β -D-glucose pentaacetate, triacetin(10 mg/ml phosphate buffer, pH 6.5) 및 acetylxylan(5 mg/ml in phosphate buffer, pH 6.5)을 기질로 사용하였으며 acetylxylan의 경우 인산 완충 용액(pH 6.5)에 첨가하여 30초간 vortex mixer로 혼합하여 사용하였다. 반응은 기질용액 0.5 ml에 효소 0.5 ml를 첨가, 45°C에서 30분간 시킨 후 0.1 N H₂SO₄ 10 μ l를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 반응정지 후 반응액은 원심분리하여 불용성 잔여물을 완전 제거하고 상등액의 일정량을 취하여 효소 반응에 의해 생성된 acetic acid을 HPLC를 이용하여 정량하였으며 1분 동안에 1 μ mole의 acetic acid를 생산할 수 있는 효소량을 1 unit로 표시하였다. HPLC 분석은, HPX-87H column (7.8 \times 300 mm, Bio-Rad)과 mobile phase로 0.01 N H₂SO₄ 용액을 사용하여 0.5 ml/min의 속도로 용출시켜 분석하였다.

단백질 정량 및 환원당 측정

단백질 정량은 bovine serum albumin을 표준 단백질로 사용한 Lowry 법(30)을 이용하였으며, xylan 가수분해로 생성된 환원당은 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 방법(31)을 이용 비색 정량하였다.

결과 및 고찰

*B. stearothermophilus*의 acetylerase multiplicity 확인

전보(19)에서 이미 언급한 바와 같이 acetyl xylan esterase 유전자(*estI*) 공여 균주인 *B. stearothermophilus*는 *estI* 유전자가 클로닝된 재조합 플라스미드인 pKMG6를 가지고 있는 *E. coli* 균주에 비해 약 5.2배 가량의 높은 acetyl xylan esterase의 비활성을 나타내었다. 이와 같은 *B. stearothermophilus*가 높은 acet-



Fig. 1. Expression of tributyrin degradation activity of the *Bacillus stearothermophilus* gene in *E. coli* HB 101.

Incubation of *E. coli* strains was done at 37°C for 18 hours followed by that of *B. stearothermophilus* at 45°C for 18 hours.

1: *Bacillus stearothermophilus*, 2: *E. coli* HB101/pKMG7, 3: *E. coli* HB101/pBR322, 4: *E. coli* HB101/pKMG6

ylesterase 활성을 나타내는 원인 중의 하나로 acetyl xylan esterase의 multiplicity를 생각할 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 예비 실험으로 4-methylumbelliferyl acetate를 기질로 이용한 zymogram 분석법을 활용하여 *B. stearothermophilus*의 acetylerase multiplicity를 조사하였다. 그 결과 *B. stearothermophilus*는 *estI* esterase 외에도 최소한 3개 이상의 서로 다른 acetyl-esterase를 생산하고 있다는 것을 알 수 있었다(Fig. 5 참고). Enzyme multiplicity는 substrate cross-specificity, glycosylation이나 proteolysis와 같은 post-translational modification의 차이 또는 별개 생산 유전자의 존재 등으로 설명할 수 있다. 그러나 본 연구에서는 native xylan 가수분해에 있어서 각종 esterase의 중요 역할을 고려하여 *estI* 외에 또 다른 esterase 존재를 추정하고 새로운 esterase 유전자의 분리, 클로닝을 시도하였다.

estII 유전자의 분리 클로닝

B. stearothermophilus chromosomal DNA를 *EcoRI*으로 부분 절단하여 분리 회수한 3~9 kb의 DNA 단편을, *EcoRI*으로 완전 절단하고 CIP 처리한 pBR 322 플라스미드 DNA에 ligation 시켜 *E. coli* HB101 균주를 형질전환 시켰다. 약 7,000개의 형질전환체를

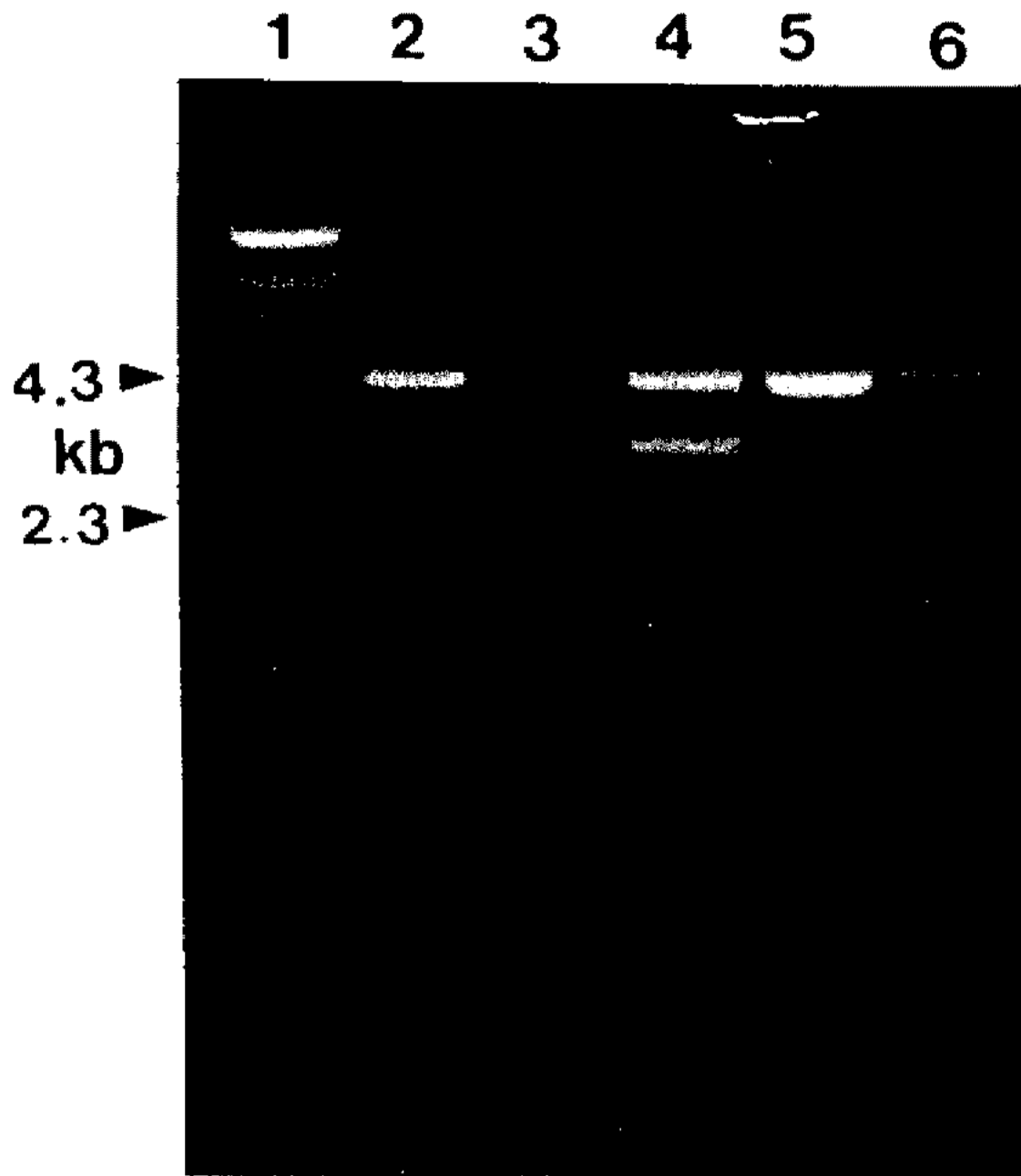


Fig. 2. Agarose gel electrophoretic patterns of *Hind*III and *Eco*RI digests of pKMG6 and pKMG7. Lane 1: *Hind*III digest of λ DNA, Lane 2: *Eco*RI digest of pBR322, Lane 3: *Hind*III digest of pKMG6, Lane 4: *Eco*RI digest of pKMG7, Lane 5: *Eco*RI+*Hind*III digest of pKMG7, Lane 8: *Eco*RI+*Hind*III digest of pKMG6

얻어 ampicillin과 tributyrin을 첨가한 LB 한천배지에 접종하여 18시간 가량 배양하였다. 이들 중 3개의 colony 주위에 tributyrin 분해에 기인되는 뚜렷한 투명환을 관찰할 수 있었다. 따라서 상기 세 형질전환체를 분리하고 그들의 tributyrin 분해 활성기능을 분석 조사해 본 결과, 세 형질전환체가 모두 약 3.2 kb의 동일한 외래 DNA가 삽입된 재조합 플라스미드를 가지고 있음을 확인하였다. 한편 상기 tributyrin 분해활성과 관계되는 3.2 kb 삽입 DNA 단편이 전보에 보고한 *est*I 유전자와 동일한 것인가를 확인하기 위하여 우선 일차로 *Eco*RI과 *Hind*III를 이용, 클로닝한 두 DNA 단편의 restriction pattern을 비교해 본 결과 Fig. 2에 표시되어 있는 바와 같이 상기 3.2 kb 삽입 외래 DNA 단편은 *est*I 유전자 DNA와 전혀 다른 DNA 단편임을 알 수 있었다. 따라서 상기 3.2 kb를 포함하고 있는 재조합 플라스미드와 삽입 DNA 상의 esterase 활성관련 유전자를 각각 pKMG7과 *est*II로 명명하였다.

pKMG7 재조합 플라스미드의 제한 효소지도

pKMG7에 삽입된 3.2 kb 삽입 DNA의 구체적인 제한효소 지도를 작성하기 위하여 각종 효소를 이용, 상기 DNA 단편을 분석하여 Fig. 3과 같은 지도를

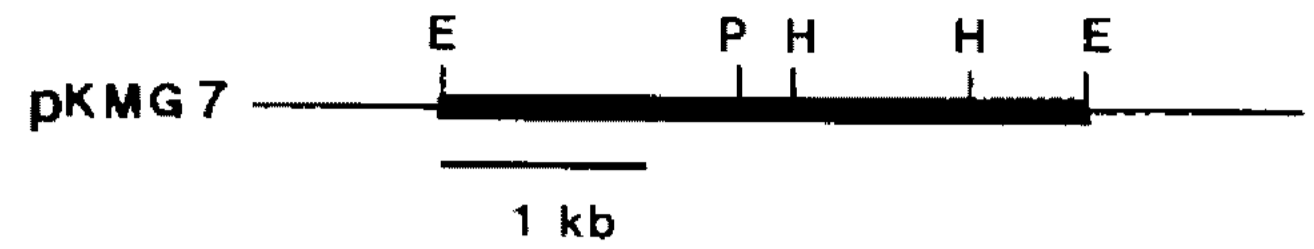


Fig. 3. Restriction map of pKMG7. E, P and H represent *Eco*RI, *Pvu*II and *Hinc*II, respectively. The thick line represents cloned 3.2 kb DNA insert of pKMG7. The thin line represents pBR322.

얻을 수 있었다. 즉 3.2 kb 삽입 DNA 상에는 *Hinc*II, *Pvu*II, *Hind*III site의 존재를 확인할 수 있었으나 *Hind*III site는 너무 많이 존재하여 정확한 위치 결정이 불가능하였고, 두 개의 *Hinc*II site와 한 개의 *Pvu*II site를 결정하였다.

*est*II esterase 유전자의 유래

pKMG7에 클로닝된 esterase 생산 유전자의 유래 확인 실험으로, 3.2 kb 삽입 DNA를 dig-labeling 하여 얻은 probe DNA와 *Eco*RI, *Hinc*II, *Pvu*II, *Hind*III로 완전 절단한 *B. stearothermophilus* chromosomal DNA 단편을 hybridization 시켰다. Fig. 4의 결과에서 볼 수 있는 바와 같이, 상기 probe는 pKMG7 DNA를 *Eco*RI으로 절단해서 얻어지는 3.2 kb 삽입 DNA 단편은 물론이고 같은 위치에서 *Eco*RI 절단 chromosomal DNA 단편과 hybridization 하여 한 개의 band를 생성하였다. 또한 예상했던 바와 같이 chromosomal DNA 중 *Hinc*II 처리된 lane 3에서는 크고 작은 세 개의 band, 그리고 *Pvu*II 처리된 경우(lane 4)는 2개의 band를 관찰할 수 있었으나 *Hind*III로 절단된 chromosomal DNA 경우(lane 2)에는 2개의 hybridization band 만이 형성되었다. 이와 같은 결과는 3.2 kb 삽입 DNA 상의 다수의 *Hind*III site 존재로 크기가 매우 작은 DNA 단편들이 생성, 본 실험에 사용한 gel 상에서는 분리가 불가능하였기 때문으로 추측된다. 또 *Hind*III로 절단된 pKMG6의 DNA 단편과는 hybridization band를 형성하지 않은 것으로 나타났다. 이상의 실험 결과로 pKMG7에 삽입된 3.2 kb 외래 DNA는 *B. stearothermophilus*에서 유래되었으며 동시에 삽입 DNA 상의 tributyrin 분해 활성 관련 유전자는 *est*I과는 전혀 다른 유전자임을 확인할 수 있었다. 또한 4-methylumbelliferyl acetate를 기질로 한 zymogram 분석을 실시해 본 결과, pKMG7의 3.2 kb 삽입 DNA 상의 *est*II 유전자의 발현에 의해 acetylcyste-
rase가 생산되며, 또 이 효소는 *est*I acetylcyste-
rase와는 분명히 다른 별개의 효소라는 것을 확인할 수 있었고 *B. stearothermophilus*는 *est*I과 *est*II 효소외에도 이들보다 분자량이 큰 최소한 2개 이상의 또 다른

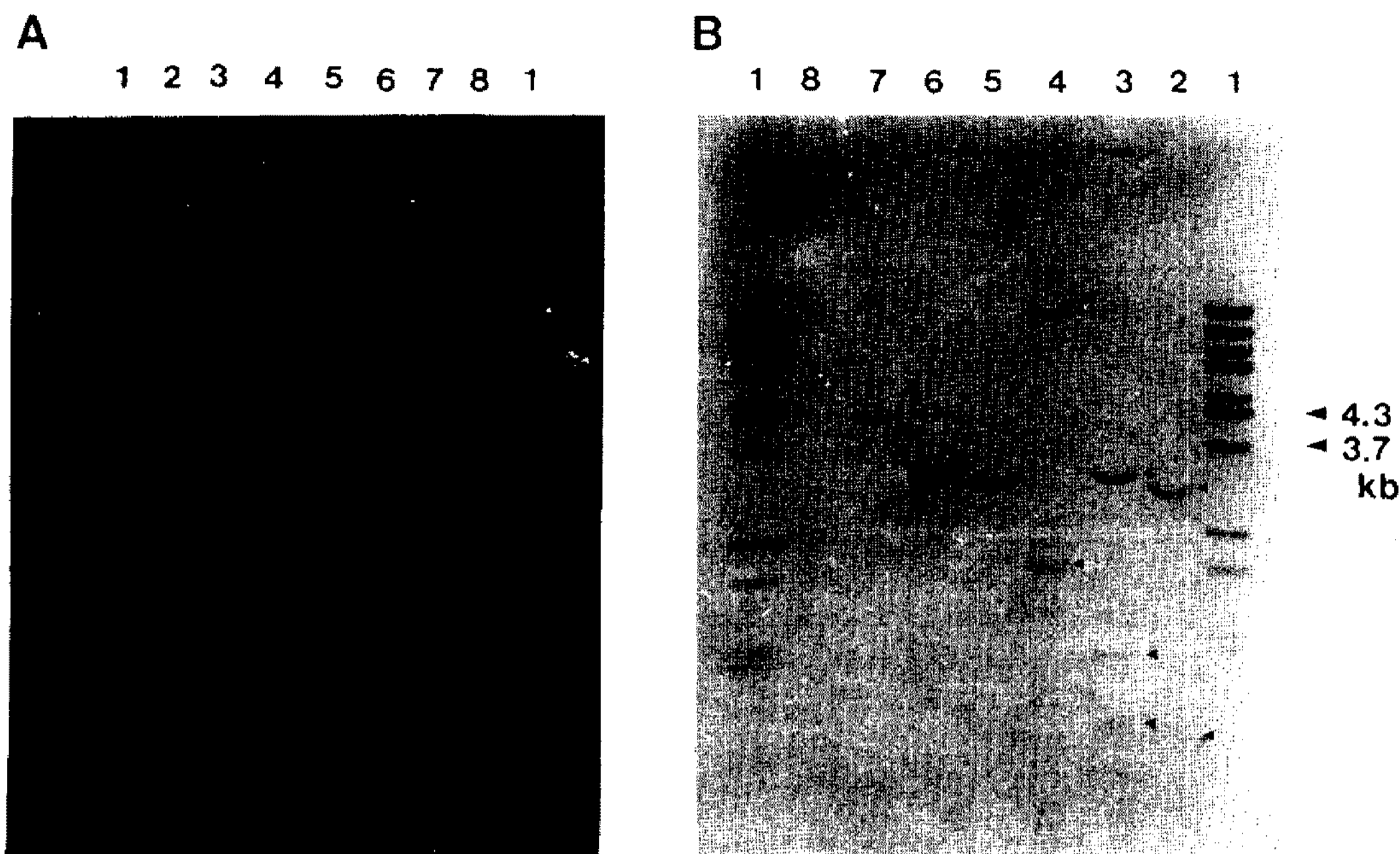


Fig. 4. Southern hybridization of *B. stearothersophilus* genomic DNA with random-primed DNAs synthesized from the DNA insert of pKMG7.

A: DNA electrophoretic patterns, B: Southern blot patterns

Lane 1: λDNA digested with *Bst*EII, Lane 2: Chromosomal DNA digested with *Hind*III, Lane 3: Chromosomal DNA digested with *Hinc*II, Lane 4: Chromosomal DNA digested with *Pvu*II, Lane 5: Chromosomal DNA digested with *Eco*RI, Lane 6: pKMG7 digested with *Eco*RI, Lane 7: pBR322 digested with *Eco*RI, Lane 8: pKMG6 digested with *Hind*III

The arrows indicate the bands which are specifically hybridized with the DNA insert of pKMG7.

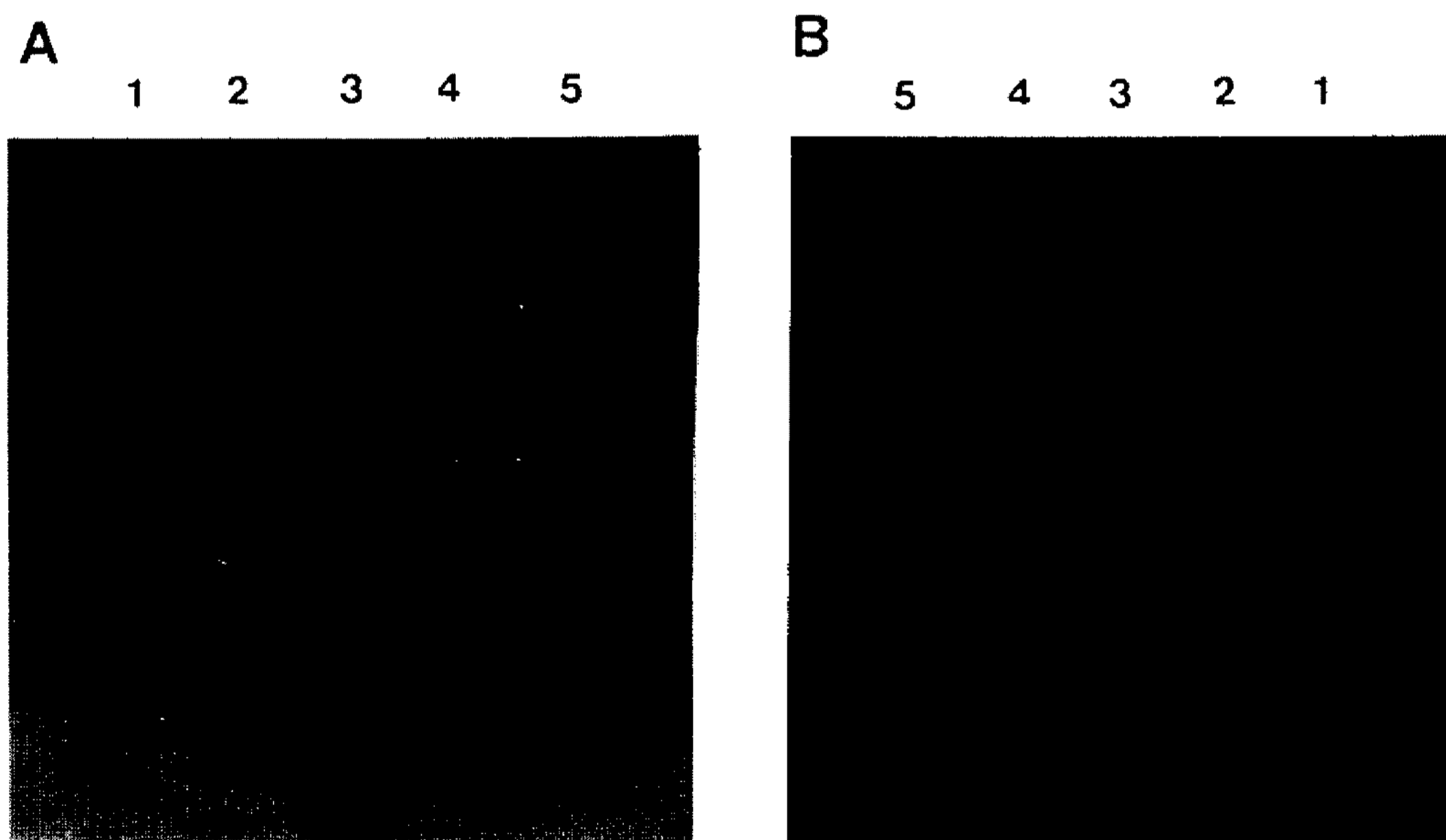


Fig. 5. Zymogram of acetylerase from *B. stearothersophilus*, *E. coli* HB101/pKMG6 and *E. coli* HB101/pKMG7.

A: protein bands (coomassie blue staining), B: activity bands

Lane 1: *E. coli* HB101/pKMG7, Lane 2: Extracellular protein of *B. stearothersophilus*, Lane 3: Intracellular protein of *B. stearothersophilus*, Lane 4: *E. coli* HB101/pKMG6, Lane 5: *E. coli* HB101/pBR322

acetylerase를 생산하고 있음을 발견하였다(Fig. 5).

*est*II 생산 효소의 기질 특이성

Tributylin을 분해하여 투명환을 형성하는 *est*II 유

Table 1. Substrate specificity of the cell-free extract of *E. coli* HB101 containing the recombinant plasmid pKMG7 or pKMG6

Substrate	Specific activity (U/mg)	
	pKMG7	pKMG6
MAS ¹	136.39	74.15
p-NPA ²	1.86	1.63
p-NPP ³	0.35	0.37
p-NPB ⁴	0.75	0.43
p-NPV ⁵	0.14	0.20
Glucose-pentaacetate	2.10	10.89
Xylose-tetraacetate	3.95	5.31
Triacetin	7.65	1.97

¹methylacetylsalicylate, ²p-nitrophenylacetate, ³p-nitrophenylpropionate, ⁴p-nitrophenylbutyrate, ⁵p-nitrophenylvalerate **Enzyme reactions were carried out as described in Materials and Method.

Table 2. Measurement of acetylxylan esterase activities of *E. coli* HB101 containing the recombinant plasmid pKMG7 or pKMG6

Strain	Specific activity (mU/mg)
pKMG7/ <i>E. coli</i> HB101	28.14
pKMG6/ <i>E. coli</i> HB101	32.16

*Enzyme reaction was carried out at 45°C for 1 hour in the mixture containing 0.5 ml acetyl birchwood xylan and the same volume of enzyme solution. **Acetic acid produced by the enzyme was quantitated by HPLC.

전자의 *E. coli*로부터의 산물을 정확히 분류하기 위해 여러가지 에스터 기질에 대한 *estII* 산물의 효소 활성을 측정해 보았다. Table 1에 표시되어 있는 바와 같이 *estII* esterase는 *estI* acetylxylan esterase와 마찬가지로 각종 acetyester 기질에 대해 높은 활성을 보이고 있어 일종의 acetyesterase로서 *estI* esterase와 비슷한 기질 특이성을 가진 효소로 분류할 수 있었다. 또한 Table 2와 같이 *estII* acetyesterase는 acetylated birchwood xylan 기질에 대해서도 *estI* esterase와 비슷한 정도의 효소활성을 보이고 있어 *estII* 효소 역시 일종의 acetylxylan esterase인 것으로 확인되었다. 그러므로 *B. stearothermophilus* genome 상에는 기질 특이성에 큰 차이가 없는 두 개의 서로 다른 acetylxylan esterase 생산유전자의 존재가 확인되었으며 그 생리적 의의가 무엇인지 앞으로 연구 규명해야 할 매우 흥미있는 과제가 아닐 수 없다.

Table 3. Synergism of esterase and xylanase in the enzymatic degradation of xylan substrates

Substrate	Enzyme used	
	Xylanase	Acetyl xylan esterase + Xylanase
	Reducing sugar produced (μmole)	
Oat spelt	2.78	3.20
Birchwood	2.88	2.84
Acetyl oat spelt	1.83	2.91
Acetyl Birchwood	ND	1.91

*Enzyme assay was done at 45°C by incubating 1 ml of 5% xylan substrate with either 31 mU of xylanase alone or 31 mU of xylanase added after 30 min incubation with 255 mU of acetylxylan esterase. **Reducing sugar produced was measured by DNS method. ***ND: not detected

estII esterase의 xylanase에 활성에 미치는 영향 *estII* acetylxylan esterase가 xylan 가수분해에 미치는 영향을 조사하기 위하여 5%의 각종 xylan 기질용액(인산 완충용액, pH 6.5) 1 ml에 255 mU의 acetylxylan esterase를 첨가 45°C에서 30분간 반응시킨 다음 31 mU의 xylanase를 첨가하여 xylan을 가수분해시키고 생성 환원당량을 측정, 가수분해 정도를 분석하였다. Table 3과 같이 acetylxylan esterase를 전처리하지 않은 대조 실험과 비교해 본 결과, 제조과정중 대다수의 acetyl기가 제거된 것으로 알려진 시판 xylan 기질의 경우는 예상대로 뚜렷한 esterase 전처리 효과를 인정할 수 없었다. 이에 반해 acetylxylan, 특히 acetylated birchwood xylan의 경우는 현저한 acetylxylan esterase의 효과를 관찰할 수 있었다. 이와 같은 결과는 xylan 분자의 acetyl substituent가 xylanase에 대한 저항성을 증가시킨다는 지금까지의 보고(5-7)를 재확인시켜 줌과 동시에 native xylan 가수분해에 있어서의 acetylxylan esterase의 중요역할을 재인식할 수 있는 좋은 자료가 되고 있다고 하겠다.

요 약

강력한 xylan 분해균인 *Bacillus stearothermophilus* 토양 분리균에서 esterase multiplicity를 확인하고 상기 균주의 *EcoRI* 절단 genomic DNA로부터 이미 보고한 acetylxylan esterase 생산 *estI* 유전자와 다른

새로운 esterase 생산 유전자의 분리 클로닝을 시도하였다. 클로닝 vector로 pBR322, 숙주세포로 *E. coli* HB101, 그리고 1% tributyrin 함유 LB agar 배지를 선별 배지로 사용하여 약 7,000개의 형질전환체를 검색하여 3개의 tributyrin 분해 형질전환체를 분리하였다. 선별한 상기 3개의 형질전환체는 다 같이 tributyrin 분해활성과 관련된 3.2 kb의 *B. stearothermophilus* chromosomal DNA 단편을 가지고 있었으며, southern blotting과 zymogram 실험을 통하여 tributyrin 분해 활성은 *estII*로 명명한 제 2의 acetylxylan esterase 생산 유전자에 기인됨을 확인하였다.

감사의 말

본 연구는 교육부 학술연구조성비(유전공학연구)로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- Chanda, S.K., E.L. Hirst, J.K.N. Jones, and E.G.V. Percival. 1950. Constitution of Xylan from Esparto Grass. *J. Chem. Soc.* **12**: 39.
- Ehrenthal, I., R. Montgomery, and F. Smith. 1954. The carbohydrates of Gramineae II. The constitution of the hemicelluloses of wheat straw and corn cobs. *J. Am. Chem. Soc.* **76**: 5509.
- Schuerch, C. The Hemicelluloses, Pp. 191. *In the Chemistry of Wood*. R.E. Krieger Publishing Co., New York.
- Lindberg, B., K.G. Rosell, and S. Sevansson. 1973. Positions of the O-acetyl groups in pine glucomannan. *Svensk Papperstid.* **76**: 383-384.
- Bacon, J.S.D., A. Chesson, and A.H. Gordon. 1981. Deacetylation and enhancement of digestibility. *Agric. Environ.* **6**: 115-126.
- Gormann, K., D.J. Mitchell, M.E. Himmel, B.E. Dale, and H.A. Schroeder. 1989. The role of ester groups in resistance of plant cell wall polysaccharides to enzymatic hydrolysis. *Appl. Biotechnol.* **20/21**: 45-61.
- Morris, E.J. and J.S.D. Bacon. 1977. The fate of acetyl groups and sugar components during the digestion of grass cell walls in sheep. *J. Agric. Sci.* **89**: 327-340.
- Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.* **3**: 286-290.
- Muller-Harvey, I., R.D. Hartley, P.J. Harris, and E.H. Curzon. 1986. Linkage of p-coumaroyl and feruloyl groups to cell wall polysaccharides of barley straw. *Carbohydr. Res.* **148**: 71-85.
- Biely, P., J. Pulse, and H. Schneider. 1985. Acetyl xylan esterases in fungal cellulolytic systems. *FEBS Lett.* **186**: 80-84.
- Biely, P., C.R. MacKenzie, J. Puls, and H. Schneider. 1986. Cooperativity of esterases and xylanases in the enzymatic degradation of acetyl xylan. *Bio/technology* **4**: 731-733.
- Poutanen, K., J. Puls, and M. Linko. 1986. Hydrolysis of steamed birchwood hemicellulose by enzymes produced by *Trichoderma reesei* and *Aspergillus awamori*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 487-490.
- Puls, J., O. Schmidt, and C. Granzow. 1987. α -Glucuronidase in two microbial xylanolytic systems. *Enzyme Microb. Technol.* **9**: 83-88.
- Ross, N.W., K.G. Johnson, C. Broun, C.R. MacKenzie, and H. Schneider. 1992. Enzymic hydrolysis of water-soluble lignin-carbohydrate complexes from *Populus deltoides*: Effects of combination of β -mannanase, xylanase, and acetyl xylan esterase. *Enzyme Microb. Technol.* **14**: 90-94.
- Ken, K.Y., Wong, U.L. Larry, and J.N. Saddler. 1988. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: functions and application. *Microbial. Rev.* **52**: 305-317.
- Song, H.S. and Y.J. Choi. 1989. Production of xylanase by *Bacillus stearothermophilus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 289-294.
- Cho, S.G., S.S. Park, Y.I. Park, and Y.J. Choi. 1992. Molecular cloning and expression of an endo-xylanase from *Bacillus stearothermophilus* into *Escherichia coli*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **20**: 271-279.
- Oh, S.W., S.S. Park, Y.I. Park, and Y.J. Choi. 1992. Molecular cloning and expression of *Bacillus stearothermophilus* β -D-xylosidase gene in *Escherichia coli*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **20**: 136-142.
- Kim, I.S., S.G. Cho, and Y.J. Choi. 1993. Molecular cloning and Expression of the acetyl xylan esterase gene of *Bacillus stearothermophilus* in *Escherichia coli*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **21**: 542-548.
- Bolivar, F. and K. Backman. 1987. Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors. *Meth. Enzymol.* **69**: 245-280.
- Sutcliffe, J.G. 1979. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **43**: 77-81.
- MacKenzie, C.R., D. Bilous, H. Schneider, and K.G. Johnson. 1987. Induction of cellulolytic and xylanolytic enzyme systems in *Streptomyces* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2835-2839.
- Rodriguez, R.L. and R.C. Tait. 1983. *Recombinant DNA Techniques, An Introduction*. Addison-Wesley Pub.

24. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
25. Hanahan, K. 1985. Techniques for transformation of *E. coli*, Pp. 109-135. In D.M. Glover(ed.), *DNA Cloning*, Vol. 1, IRL Press, Oxford.
26. Kugimiya, W., Y. Otani, Y. Hashimoto, and Y. Takagi. 1986. Molecular cloning and nucleotide sequence of the lipase gene from *Pseudomonas fragi*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **141**: 185-190.
27. Anthony, C.F. and L.M. James. 1985. Nonradioactive hybridization probe prepared by the chemical labeling of DNA and RNA with a novel reagent, photobiotin. *Nucl. Acids Res.* **13**: 745-761.
28. Johnson, K.G., J.D. Fontana, and C.R. MacKenzie. 1988. Measurement of acetyl xylan esterase in *Streptomyces*. *Meth. Enzymol.* **160**: 551- 560.
29. Iwai, M., S. Okumura, E.L. de Leal, and Y. Tsujisaka. 1983. Purification of four esterases from *Aspergillus niger*. *Agric. Biol. Chem.* **47**: 1865-1868.
30. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
31. Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426.

(Received September 13, 1994)